Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Berlin.

Über das Vorkommen der Adenin-Nukleotide in den Geweben IV.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Heinz Rabanus
aus Dortmund

am 19. Januar 1940.

Druck: D. Häring, Leipzig C 1.

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Lothar Kreuz
Referent: Prof. Dr. med. Karl Lohmann.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

In den früheren Arbeiten dieser Reihe[1]) wurde nachgewiesen, daß in der Skelettmuskulatur, Herzmuskulatur und in roten Blutkörperchen dieselbe Adenylpyrophosphorsäure (Adenosintriphosphorsäure) gefunden wird, und daß in diesen Zellarten neben Adenylpyrophosphorsäure praktisch keine oder nur wenig freie Adenylsäure (Adenosinmonophosphorsäure) vorkommt. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, wie weit die säurelöslichen Adeninverbindungen in verschiedenen Organen als Adenylsäure bezw. Adenosintriphosphorsäure vorliegen. Unter säurelöslichen Adeninverbindungen werden diejenigen verstanden, die bei der Enteiweißung der Gewebe mit Trichloressigsäure in Lösung gehen. Hierzu rechnet z. B. nicht die Cocymase (Codehydrase 1), die vollständig nur bei der Hitzedenaturierung von den Eiweißen abgetrennt werden kann, ein Befund, der einige Widersprüche in der Literatur zu erklären vermag.

Die Versuche wurden in der Weise durchgeführt, daß die möglichst frischen Organe unter Hintanhaltung aller enzymatischen Zerfallsprozesse in eiskalter Trichloressigsäure abgetötet wurden; in äquivalenten Teilen des klaren eiweißfreien Filtrats wurde der Gehalt an leicht hydrolysierbarem Phosphat (das bei 7 Minuten langer Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° abgespalten wird und das zu $^2/_3$ als Adenylpyrophosphat P_2O_5 anzusehen ist), an desaminierbarem NH_3 und an Adenin nach Säurehydrolyse untersucht.

Das Ergebnis ist, daß in Skelettmuskulatur und in roten Blutkörperchen das gesamte säurelösliche Adenin ganz im wesentlichen als Adenylpyrophosphorsäure vorliegt, daß aber in anderen Organen wie Leber, Milz, Niere das säurelösliche Adenin nur zum kleineren Teil als Adenylpyrophosphorsäure, zum größeren Teil als Adenylsäure und ein weiterer Teil in schwankendem Ausmaß noch in einer nicht näher definierten Form vorkommt. Etwas ähnliches gilt für die kernlosen roten Blutkörperchen des Pferdes und die kernhaltigen

des Huhnes, während bei den anderen untersuchten Blutarten praktisch das gesamte säurelösliche Adenin der vorhandenen Adenylpyrophosphorsäure entspricht.

Methodik.

1. Herstellung der Extrakte.

Kaltblüterorgane wurden eisgekühlt mit der doppelten Menge eiskalter 10%iger Trichloressigsäure extrahiert, Warmblüterorgane nach Gefrieren in CO_2-Äther oder flüssiger Luft. Das Blut der Schlachthaustiere wurde aus dem eröffneten Gefäß unmittelbar in ein gewogenes Gefäß mit abgemessener Menge Trichloressigsäure einfließen gelassen, sonst nach Venenpunktion mittels Kanüle.

2. Bestimmung der Adenylpyrophosphorsäure.

Sie erfolgte entweder in dem eiweißfreien Filtrat direkt durch 7 Min. lange Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° nach Lohmann oder (besonders bei Warmblüterorganen) nach vorheriger Fällung als Quecksilbersalz. Hierdurch werden im wesentlichen nur die säurelöslichen Nukleotide gefällt. Ein aliquoter Teil des Filtrats wird in einem gewogenen Reagenzgläschen eben lackmusneutral gemacht und tropfenweise mit 25%igen Hg(2)-acetat (besser als Hg(2)-nitrat) gefällt, der Niederschlag abzentrifugiert, in mit H_2SO_4 schwach angesäuerten Wasser suspendiert, durch ein kapillares Rohr mit H_2S zersetzt und ebenso durchlüftet. Die Flüssigkeitsmenge wird durch Rückwiegen festgestellt, und aliquote Teile zur Bestimmung des direkt bestimmbaren und des leicht hydrolysierbaren Phosphats entnommen.

3. Bestimmung der Adenylsäure (vgl. Lohmann und Schuster[2]).

Sie erfolgt durch spezifische Desaminierung mit der nach G. Schmidt[3]) hergestellten Muskeladenylsäure-Desaminase. Es wurde durchweg ein Fermentpräparat verwendet, das auch Adenylpyrophosphorsäure desaminiert. Die NH_3-Bestimmung erfolgte nach Parnas[4]).

4. Bestimmung des Adenins als Pikrat.

Die Adeninnukleotide werden durch halbstündige Hydrolyse in 0,3 n HCl bei 100° gespalten, und das Adenin nach Reinigung über das CU(1)- und Ag-Salz als Pikrat gravimetrisch bestimmt. Z. B. werden 5,0 ccm des eiweißfreien Filtrats mit 1,0 ccm 2 n HCl im

zugeschmolzenen Reagenzglas im siedenden Wasserbad 30 Minuten erhitzt. Von der Lösung werden 5,0 ccm mit 2 n NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert und mit je 0,4 ccm Na-Bisulfit (Schering) und 10°/oigen $CuSO_4$ aq. gefällt und 3 Minuten erhitzt. Der Niederschlag wird mit 3 ccm Wasser, dem 1 Tropfen Bisulfit zugesetzt ist, gewaschen, in 5,0 ccm Wasser suspendiert, mit H_2S zersetzt, filtriert und durchlüftet. Zur Bestimmung genügen 2,0 ccm. Nach Zusatz von 1,0 ccm 2 n NH_3 und 0,5 ccm 2 n HCl wird mit 2 ccm n/10 $AgNO_3$ gefällt, der Niederschlag mit verdünnter HCl heiß zersetzt, das AgCl nachgewaschen, die vereinigten Lösungen im gewogenen Tigel eingeengt, der Rückstand in 1 ccm Wasser gelöst und mit 2 ccm kalt gesättigter Pikrinsäurelösung gefällt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wurde mit einem zusammen mit dem Tigel gewogenen Emich'schen Filterstäbchen abgesaugt, mit einigen Tropfen eiskalten Wassers nachgewaschen, bei 110° getrocknet und gewogen. Die Reinheit des gewonnenen Adeninpikrats wurde durch Mikroschmelzpunktbestimmung geprüft.

Tabelle I.

Organe.

Zahlen in mg Adenin pro g Frischgewicht.

Bestimmung als	Leber			Milz		Niere	
	Kaninchen	Ratte		Kaninchen		Kaninch.	Ratte
Adenylsäure (als NH_3)	0,34	0,28	0,30	0,31	0,26	0,30	0,41
Adenylsäure (nach Hg-Fällung als NH_3)	0,39					0,35	
Adeninpikrat (nach Hydrolyse)	0,55; 0,58	0,60	0,60	0,35	0,37	0,46	0,59

Ergebnis: In den untersuchten Organen liegt das säurelösliche Adenin nur zum Teil (Leber < Niere < Milz) in einer durch die Adenylsäure-Desaminase (einschließlich Adenylpyrophosphorsäure) desaminierbaren Form vor.

Tabelle II.

Blut.

Zahlen in mg Adenin.

	als Adenylpyrophosphorsäure (P-Bestimmung)	als gesamtes desaminierbares NH_2	als Adeninpikrat (nach Hydrolyse)	Freies NH_3-N in Gamma
Mensch	0,10	0,08	0,10	5
	0,09		0,10	6
	0,10		0,11	
	0,07		0,10	
Pferd	0,04	0,06	0,07	7
	0,03	0,02	0,06	
	0,03		0,04	4
Rind	0,05	0,03	0,04	2,5
	0,08		0,08	7
	0,04		0,04	
	0,03		0,02	
Esel	0,05		0,04	8
Schwein	0,17		0,25	2,5
	0,14		0,13	
	0,15		0,15	
	0,11		0,13	
	0,15		0,14	
	0,19		0,15	
Schaf	0,04	0,06	0,06	7
	0,06		0,07	6
Hund	0,05		0,07	5
	0,06		0,07	
Kaninchen	0,12		0,09	11
Huhn	0,09		0,16	6
	0,09		0,16	7
	0,11		0,13	

Ergebnis: Mit Ausnahme des Hühnerblutes und auch des Pferdeblutes liegt in dem Blut der untersuchten Tiere das säurelösliche Adenin vorwiegend als Adenylpyrophosphorsäure vor.

Tabelle III.

Muskulatur.

Kaninchen- und Froschmuskulatur. Zahlen in mg Adenin pro g Frischgewicht. Die Zahlen in einer Reihe sind Doppelbestimmungen

Bestimmung als	Kaninchen			Frosch (R. temp.)		
Adenylpyrophosphorsäure (direkt; P-Best.)	0,54	0,65	0,70		0,67	0,69
Adenylpyrophosphorsäure (nach Hg-Fällung; P-Bestimmung)	0,56			0,57		
Adeninpikrat (nach Hydrolyse)	0,55; 0,50	0,67	0,74	0,65; 0,58	0,70	0,76; 0,76

Ergebnis: Aus diesen (und anderen) Bestimmungen geht hervor, daß das säurelösliche Adenin in Muskulatur praktisch ausschließlich als Adenylpyrophosphorsäure vorliegt.

Literaturverzeichnis.

1. K. Lohmann und Ph. Schuster, III Mitt. Bio. Z. **294**, 183 (1937).
2. K. Lohmann und Ph. Schuster, Bio. Z. **272**, 24 (1934).
3. G. Schmidt, H. **179**, 259 (1928).
4. J. Parnas und Heller, Bio. Z. **152**, 1 (1924).

Lebenslauf.

Am 29. April 1911 wurde ich, Heinz Rabanus, als Sohn des Stadtinspektors Adolf Rabanus und seiner Ehefrau Elisabeth, geborene Kirmis in Dortmund geboren. Ostern 1930 bestand ich die Reifeprüfung am Bismarck-Realgymnasium in Dortmund. Nach dem Studium in Tübingen, Münster, bestand ich die ärztliche Vorprüfung in Münster im Sommer 1932 und nach weiterem Studium in Düsseldorf die ärztliche Staatsprüfung daselbst am 3. Januar 1936. Im praktischen Jahr arbeitete ich 1 Monat an den Städt. Krankenanstalten in Dortmund, 8 Monate am Stadtkrankenhaus in Siegen, 3 Monate an der orthopädischen Klinik der Charité Berlin. Die Bestallung als Arzt erhielt ich am 1. Februar 1937. Anschließend arbeitete ich als Volontärassistent an letzterer Klinik bis zum 30. September 1937, bis zum 31. Dezember 1937 als Landarztvertreter in Graefenroda und bis zum 31. März 1938 als Assistent an der orthopädischen Klinik in Königsberg. Seit dem 1. April 1938 arbeite ich als Volontär am Physiologisch-chemischen Institut der Universität in Berlin.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Lohmann für Überlassung des Themas und Förderung der Arbeit meinen herzlichsten Dank aussprechen.